Der Einfluß physikalischer Parameter auf die Eliminierung von Plasmiden durch die Diazaborine CG 3401 und WH 13

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

Vorgelegt von : Heinrich Arens
aus Brüggen

Bonn 1980

Der Einfluß physikalischer Parameter auf die Eliminierung von Plasmiden durch die Diazaborine CG 3401 und WH 13

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

Vorgelegt von : Heinrich Arens
aus Brüggen

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Wiedemann
2. Gutachter: " " P. Brühl

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Immunologie der Universität
Abteilung Medizinische Mikrobiologie für Pharmazeuten

Leiter: Professor Dr.B. Wiedemann

Druck: Druckerei Schmitz, Brüggen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	10
2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	10
2.2 Verwendete Nährmedien	11
2.3 Verwendete Substanzen und Antibiotika	12
2.4 Methode zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	14
2.5 Methode zur Bestimmung der Keimzahl	15
2.6 Methode zur Eliminierung von Plasmiden	15
2.7 Replika-Technik	16
3. Eigene Ergebnisse	18
3.1 Bestimmung der MHK der verwendeten Stämme	18
3.2 Elimination von R 1767 durch Diazaborin CG 3401 und WH 13	19
3.3 Elimination von F'lac$^+$ durch Diazaborin CG 3401 und WH 13	21
3.4 Zeitabhängigkeit der Elimination von R 1767 mit Diazaborin CG 3401	23
3.5 Temperaturabhängigkeit der Elimination von F'lac$^+$ mit Diazaborin CG 3401	25
3.6 Einfluß des pH-Wertes auf die Elimination von F'lac$^+$ durch Diazaborin CG 3401	26
3.7 Zeitabhängigkeit der Elimination von F'lac$^+$ bei optimaler Wasserstoff-Ionen-Konzentration	29
3.8 Elimination von F'lac$^+$ bei E.coli W 3110 Nx^r unter Berücksichtigung der Keimzahl	32
4. Diskussion und Zusammenfassung	35
5. Literaturverzeichnis	38

1. Einleitung

Die Resistenzentwicklung ursprünglich antibiotika-sensibler Bakterienstämme stellt für den klinischen Mediziner, der rasch wirkende Chemotherapie und vernünftigen Antibiotika-Einsatz miteinander vereinbaren muß, ein großes Problem dar.
Da die Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika immer von einer neuen Resistenzentwicklung gefolgt ist, ist die Aufklärung der Mechanismen der Resistenzentwicklung von großem Interesse.
Nach Jawetz, Melnick und Adelberg (16) können resistente Varianten durch drei verschiedene Mechanismen entstehen:

1. durch Mutationen, mit einer Frequenz von $1:10^5$ bis $1:10^9$
2. durch Rekombination und
3. durch den Erwerb zusätzlicher genetischer Information, sogenannter Plasmide.

Plasmide sind nach Falkow (8) zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle mit einem Molekulargewicht von $4-8 \times 10^7$. Sie stellen unabhängige Einheiten der Replikation, sogenannte Replicons, dar und sind für die Lebensfähigkeit der Bakterien nicht essentiell.

Nach Jawetz, Melnick und Adelberg (16) unterscheidet man Plasmide mit unterschiedlichen Eigenschaften.

1. F-Plasmide (F-Faktoren)
   Sie vermitteln die Übertragung von genetischen Informationen, indem sie über den Sex-Pilus - einen durch Plasmidgene kodierten Proteinfaden - neusynthetisierte DNA von F^+- Donor-Zellen auf F^- -Rezipienten-Zellen übertragen.
2. R-Plasmide (R-Faktoren)
   Diese tragen Gene, die der Wirtszelle Resistenz gegen verschiedene Antibiotika vermitteln.
   Wiedemann (19) legt dar, daß der größte Teil dieser Plasmide mit Funktionen belegt ist, die für die In-

fektiösität bzw. deren Übertragung notwendig sind. Dies ist der sogenannte RTF (Resistenz-Transfer--Faktor). Der kleinere Teil ist mit sogenannten Resistenz-Determinanten besetzt, die die Wirtszellen in die Lage versetzen bestimmte Antibiotika zu tolerieren. Der Anstieg der Resistenz ist hauptsächlich auf die Existenz solcher R-Plasmide zurückzuführen, da chromosomalresistente Bakterienmutanten aufgrund der Genomveränderung Virulenzverluste gegenüber ihren Elternzellen aufweisen und daher weniger lebensfähig sind.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten den Resistenzanstieg zu verhindern oder sogar rückgängig zu machen.

1. Den sparsamen und gezielten Einsatz von Chemotherapeutika nach Anlegung von Antibiogrammen. Das ist jedoch unter den Eingangs erwähnten klinischen Bedingungen nicht immer möglich und würde den Resistenzanstieg allenfalls verlangsamen.
2. Durch Ausschaltung der die Resistenz codierenden Plasmide durch geeignete Substanzen, sogenanntes"Plasmid-curing" (7). Dies ist identisch mit dem Begriff der Plasmid--Eliminierung. Diese Begriffe sagen nichts über den Mechanismus der Eliminierung aus, sondern beschreiben phaenomenologisch lediglich den Verlust phaenotypischer Eigenschaften. Falkow: (7) "Untersucht man den Effekt einer Substanz auf die Eliminierung von F'lac$^+$ oder eines R-Faktors, so bedeutet das Nichterscheinen der Eigenschaft lac$^+$ oder Antibiotika-Resistenz eine Eliminierung der Eigenschaft lac$^+$ oder der Resistenz".

F-Faktor und R-Faktor Eliminierung durch verschiedene Substanzen sind in der Literatur beschrieben. Hirota und Iljima (15) konnten mit Aminoacridinen insbesondere mit Acriflavin das F-Plasmid von E.coli K12 W 3110 in fast 100% der Fälle eliminieren. Hirota (14) bestätigte die Ergebnisse und stellte folgende Bedingungen für die Eliminierung von Plasmiden auf:

1. enge pH-Aktivitätsgrenzen in Relation zu den Dissoziationskonstanten der Aminoacridine
2. geringe Bakterieninokulation von weniger als 10^4 Zellen/ml
3. organ. Wachstumsmedien
4. Wachstumsperiode länger als 6 h
5. physiol. Inokulationstemperatur von 37°C zur Erreichung optimalen bakteriellen Wachstums

Watanabe und Fukasawa (18) berichteten 1961, daß Acriflavin und Acridin Orange F-Faktoren und R-Determinanten verschiedener R-Plasmide eliminieren.

Bouanchaud, Scavizzi und Chabbert (3) berichteten 1969 , daß Ethidium Bromid F'lac$^+$und R-Faktoren aus E.coli eliminierten.

Dies wurde von Hahn und Ciak (11), die vergleichend die Wirkung von Ethidium Bromid, Acridin Orange, Chloroquin, Miracil D, Berberin, Spermin, p-Rosalinin und Methylen-Blau auf die F-und R-Faktoren-Elimination untersuchten, bestätigt.

Hahn (10) gibt zwei Möglichkeiten der Plasmideliminierung an.

1. Elimination von R-Faktoren
2. Hemmung der R-Faktor-Übertragung
   a) indirekte Hemmung mit Elimination der R-Determinanten
   b) direkte Hemmung der R-Faktor-Übertragung ohne Eliminierung von R-Determinanten.

Nach Franklin und Snov (9) sind zwei verschiedene Mechanismen für die Elimination verantwortlich:

1. Zerstörung der Matrizenfunktion der Nucleinsäure durch Interaktion der Substanzen mit der Nucleinsäure: Interkalierung
2. Direkte Hemmung der spezifischen Polymerase infolge Interferenz zwischen Inhibitor und Matrizenmolekül, die zu tiefgreifenden Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Makromoleküls führt.

Die eliminierenden Substanzen Actinomycin D und Acridin bzw. Phenatridine demonstrieren die beiden unterschiedlichen Mechanismen. Actinomycin D besitzt die Fähigkeit

durch Bindung an die doppelsträngige DNA die DNA-abhängige RNA-Synthese zu hemmen und somit also auch die Replication des Plasmids zu verhindern.

Franklin und Snow (9) vermuten als Mechanismus die Hemmung der RNA-Kettenangliederung durch Bewegungshinderung der spezifischen Polymerase an der Stelle der DNA, an der das Actinomycin D gebunden wird. Dies führt zu folgenden Änderungen der physikal. Eigenschaften der DNA:

1. Abfall der Bindungsintensität
2. Viskositätszunahme der DNA-Lösung
3. Zunahme der DNA-Reaktionstemperatur (Thermische Stabilität). Dies bedeutet einen größeren Energieaufwand zur Trennung der beiden Stränge.

Acridine und Phenantridine wirken durch Intercalierung, ein Mechanismus den Lerman (17) beschrieben hat:
Flache, geschlossene heterocyclische aromatische Ringsysteme lagern sich zwischen aufeinanderliegenden Basenpaaren in der Doppelhelixstruktur der DNA ein. Die Zwischenräume für die Intercalierung werden durch lokales Untwisting der DNA-Doppelhelixstruktur von ungefähr 12° frei. Dadurch werden die benachbarten Basenpaare um etwa 3,5 A voneinander getrennt(4).
Die Stabilisierung der Intercalierung erklärt sich durch elektrostatische Anziehung zwischen Ringsystemen der intercalierenden Substanzen und den Phosphatgruppen der Basenpaare.
Nach der Hypothese von Hahn und Ciak (11, 12) wird so durch vielfache Einlagerung intercalierender Substanzen die normal gedrehte zirkuläre Plasmid-DNA in eine unnatürliche Form überführt und fixiert,wodurch die Replikation des Plasmids verhindert wird.
Einige wenige Substanzen wirken als spezifische Übertragungshemmer, d.h. die Plasmid-DNA wird zwar repliziert, kann aber nicht in die Zellen übergehen, durch Verhinderung der Bildung von Paaren. Auch hier tritt also phaenomeno-

logisch eine Elimination auf. Die meisten Substanzen wirken wahrscheinlich durch eine Kombination der Mechanismen.

Diese Tatsachen sind für die klinische Medizin von großer Bedeutung.

Hahn (10) machte den Vorschlag therapeutisch eine Komibination von R-Plasmideliminierenden Substanzen und Antibiotika anzuwenden, oder Substanzen zu finden, die sowohl antibakteriell als auch Plasmid-eliminierend wirken, sogenannte Breitspektruminhibitoren, um die Antibiotikasensibilität von Tochterzellen sensibler Bakterien wiederherzustellen und so die wieder empfindlich gewordenen Keime mit Hilfe von Antibiotika abzutöten.

Neuerdings ist es Böffel (2) gelungen mit Hilfe des Diazaborins CG 3401 der Chemie Grünenthal F- und R-Plasmide bei E. coli in unterschiedlich hoher Zahl zu eliminieren.
Auch bei dieser Substanz ist der Wirkungsmechanismus nicht bekannt.
Diazaborin wird von der Firma Chemie Grünenthal als spez. Harnwegstherapeutikum mit bakteriostatischen Eigenschaften gegen gramnegative Erreger angesehen. Es besitzt keine Wirkung auf grampositive Microorganismen und Pseudomonas aeruginosa.

Das oben erwähnte Diazaborin scheint eine Substanz zu sein, die Plasmid-eliminierende und antibiotische Eigenschaften in sich vereint.
Hahn (13) selber hat Ampicillin mit eliminierenden Substanzen kombiniert und dabei Salmonella typhimurium R 1^{+}, resistent gegenüber 2500 ug Ampicillin/ml , mit einer Kombination aus nur 60 ug Ampicillin/ml und Quinacricine ($4x10^{-4}M$), Ethidium Bromid ($10^{-4}M$), Tiloron ($10^{-4}M$) oder Nitroacridin ($5x10^{-6}M$) abgetötet.
Sowohl die Ergebnisse von Hahn (10,11,12,13) als auch die von Böffel (2) lassen hoffen, daß Hahns (10) Therapievorschlag eines Tages Einzug in die klinische Routine halten wird.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, den Einfluß physikalischer Größen auf die Elimination von F- und R-Plasmiden durch die Diazaborine CG 3401 und WH 13 der Chemie Grünenthal (5) näher zu untersuchen, um so ein Maximum an R-Faktoren tragenden Zellen wieder Antobiotika-sensibel zu machen, die dann durch die antibiotische Komponente derselben Substanz oder eines zugesetzten Antibiotikums abgetötet werden sollen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Bezeichnung der Bakterienstämme	chromosomale Marker	Plasmide	Plasmidmarker
a)E.coli K12 W 3110	$Nx^{s}Rif^{s}lac^{+}$	------	------
b)E.coli K12 W 3110	$Rif^{r}lac^{-}$	$F'lac^{+}3615a$	lac^{+}
c)E.coli K12 W 3110	$Nx^{r}lac^{-}$	$F'lac^{+}3615b$	lac^{+}
d)E.coli K12 W 3110	$Nx^{r}lac^{+}$	R 1767	$A^{r};C^{r};\ S^{r};$ $T^{r};$ ColI; tra^{+}

Die Auswahl der Stämme wurde folgendermaßen getroffen:
Die Stämme, die zur Elimination von $F'lac^{+}$ benutzt wurden, mußten das F-Plasmid tragen, durften aber als chromosomalen Marker nicht lac^{+} sein, um phaenomenologisch anhand der Lactosespaltung den Verlust des F-Plasmids nachzuweisen.
(s.o. Stamm b und c)
Der Stamm der zur Eliminierung des R-Plasmid benutzt wurde, durfte analog dazu als chromosomalen Marker keine der durch R 1767 codierten Antibiotikaresistenzen aufweisen (s.o. Stamm d) .
Zur Kontrolle wurde ein Stamm benutzt der kein Plasmid trägt.

2.2. Verwendete Nährmedien

2.2.1 Chinablau -Lactose-Agar (CL-Agar)
(Merck Art.-Nr. 2348)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Fleischextrakt	3,0
Pepton aus Casein	5,0
Lactose	10,0
Chinablau	0,375
Natriumchlorid	5,0
Agar-Agar	12,0

35g werden in einem Liter Aqua dest. oder Aqua dem. suspendiert, 15 Minuten eingeweicht und bis zum vollständigen Auflösen im Dampftopf gekocht. Anschließend 20 Minuten sterilisieren im Autoklaven bei 121°C und 1,1 atm. pH-Wert-Einstellung auf 7,2.
Bei Bedarf Antibiotikazusatz nach Abkühlen auf 60°C.

2.2.2 Standard I-Nähr-Agar (NI-Agar)
(Merck Nr. 7881)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Spezialpepton	15,6
Hefeextrakt	2,8
Natriumchlorid	5,6
D (+) -Glucose	1,0
Agar-Agar	12,0

Suspension von 37g in einem Liter Wasser. Nach Verflüssigung im Dampftopf 20 Minuten sterilisieren im Autoklaven bei 121°C mit 1,1 atm Druck.
Einstellung auf den pH von 7,4-7,6.
Bei Bedarf Antibiotikazusatz nach Abkühlung auf 60°C.

2.2.3 Standard I-Nähr Bouillon (NI-Bouillon)
(Merck Nr. 7882)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Spezialpepton	15,6
Hefeextrakt	2,8
Natriumchlorid	5,6
D (+) -Glucose	1,0

Lösung von 25g in 1 Liter Aqua dest oder Aqua dem. Sterilisation im Autoklaven 20 Minuten bei 121°C und 1,1 atm

pH-Wert-Einstellung auf pH 7,4 - 7,6.

2.2.4 Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon)
(BBL= Becton Dickinson GmbH, Heidelberg,manufactured in USA)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Rindfleischinfusion	3,0
Acidase TM Pepton	17,5
Stärke	1,5

pH: 6,6 - 8,0 je nach Einstellung

22g des Pulvers werden in 1 Liter Aqua dest. gelöst. Nach Abfüllen in Röhrchen zu je 1 ml erfolgt die 20-minütige Sterilisation im Autoklaven bei 121°C und 1,1 atm.

2.3 Verwendete Substanzen und Antibiotika

2.3.1 70%-iger Alkohol im Verh. 1:10 mit Aqua dest.
(zum Lösen von 2.3.6)

2.3.2 Dimethylsulfoxid (DMSO) (zur Synthes; Merck Schuchhardt, Hohenbrunn Nr. 802912)
(zum Lösen von (Rif) 2.3.12)
(16mg Rif/1ml (DMSO))

2.3.3 Physiologische Kochsalzlösung (0,9 g NaCL/l)

2.3.4 0,1 normale NaOH (zum Lösen von 2.3.14)
(Merck Darmstadt)

2.3.5 Tris-Puffer (zum Lösen von 2.3.11(Na) im Verh. 1:10)
(Tris(hydroxymethyl-)aminomethan, Merck Darmstadt Nr. 8387)
(2 mg Na + 20mg Tris/1ml H_2O)
zur Einstellung des pH der Nährmedien

2.3.6 Ampicillin (Amblosin^R, Hoechst AG, Frankfurt/Main Reg. No. 1384)

2.3.7 Chloramphenicol (Charge No. 414246,Boehringer Mannheim)

2.3.8 Diazaborin (CG 3401) C Grünenthal GmbH, Stolberg/Rheinl., ChargenNo. 10413 a)

2.3.9 Diazaborin (WH13) Grünenthal GmbH, Stolberg/Rheinl.)

2.3.10 Kanamycin als Kanamycinmonosulfat (Ber. auf Base) (Charge 5; Grünenthal GmbH)

2.3.11 Nalidixinsäure (Winthrop Laboratories Ltd. DEV 903)

2.3.12 Rifampicin Reinsubstanz (Grünenthal GmbH, Chargen-No.31)

2.3.13 Streptomycin als Streptomycinsulfat (Op.H 306)

2.3.14 Sulfonamid (Gantanol^R Substanz, Hoffmann La Roche, Op. 183771)

2.3.15 Tetrazyklin (als Hostacyclin^R Hoechst, Op.-Nr. 51)

2.3.16 Die unter 2.3.5 -2.3.14 aufgeführten Chemotherapeutika wurden dem Chinablau-Lactose-Agar bei 60°C in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin	(=A)	:	20 ug/ml
Chloraphenicol	(=C)	:	20 ug/ml
Nalidixinsäure	(=NA)	:	20 ug/ml
Rifampicin	(=Rif)	:	100 ug/ml
Streptomycin	(=S)	:	10 ug/ml
Sulfomanid	(=Su)	:	400 ug/ml
Tetrazyklin	(=T)	:	10 ug/ml

2.4 Methode zur Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK)

Von den zu testenden gelösten Substanzen wurden Verdünnungsreihen in jeweils 1 ml Müller-Hinton-Bouillon hergestellt, so das sich folgende Lösungskonzentrationen ergaben: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, o,5 und o,25 ug/ml. Als Kontrolle diente ein Röhrchen mit Müller-Hinton-Bouillon ohne Zusatz. Mit o,25 ml (1 Tropfen aus einer 1 ml Pipette) der 1:1000 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Bakterienkultur wurde dann die Verdünnungsreihe beimpft.

Nach 18 Stunden bei 37°C konnte anhand des Vergleiches der bebrüteten substanzhaltigen Röhrchen mit dem Kontrollröhrchen festgestellt werden, bei welcher Konzentration gerade kein Wachstum der Keime mehr auftrat. Die Konzentration, bei der makroskopisch keine Trübung zu erkennen war, entsprach der Minimalen Hemmkonzentration(MHK) der getesteten Substanz gegenüber den untersuchten Bakterienstämmen.

2.5 Methode zur Bestimmung der Keimzahl

Die zu untersuchende Kultur wurde zur Keimzahlbestimmung 1:10 bis zu 1: 10^6 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.
Von diesen Verdünnungen wurde jeweils 0,1 ml auf getrockneten Chinablau-Lactose-Agar-Platten mit sterilen Glasspateln aufgespatelt.

Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C erfolgte die Auszählung der gewachsenen Kolonien und die Berechnung der Keimzahl/ml.

2.6 Methode zur Eliminierung von Plasmiden

Nachdem die zu untersuchenden Bakterienstämme mit ihren R-Plasmiden hinsichtlich ihrer Antibiotika-Resistenz überprüft worden waren, wurde jeweils 1 Einzelkolonie der auf den Antibiotika-haltigen Cl-Agar-Platten gewachsenen Bakterienkolonien in 4,5 ml steriler NI-Bouillon eingeimpft und über Nacht (ca. 18 Stunden im Brutschrank bei 37°C)bebrütet.
Am nächsten Morgen wurde die getrübte Bakteriensuspension 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. 0,1ml dieser Verdünnugn wurde in 4,5 ml frische ,sterile NI-Bouillon mit 0,5 ml Diazaborinlösung gegeben (standardisierte Keimeinsaat).

Die folgenden Endkonzentrationen wurden verwendet:
0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 ug/ml.
Die Diazaborin-Konzentrationen lagen dabei um eine oder mehrere Stufen unter der MHK, so daß keine Hemmung des Bakterienwachstums resultieren konnte.

Nach der statischen 18-stündigen Bebrütung ($37^{o}C$) wurde die gewachsene Bouillonkultur in physiologischer Kochsalzlösung bis 10^{-5} und 10^{-6} verdünnt, mit sterilen Glasspateln auf Chinablau-Lactose-Agar-Platten ausgespatelt und über Nacht bei $37^{o}C$ bebrütet.
Nach der Keimzahlbestimmung am nächsten Morgen wurde die F-Faktor - und R-Faktor-Eliminierung auf unterschiedlichen Wegen nachgewiesen.

F-Faktor-Eliminierung

Kolonien, die das F'lac Plasmid verloren haben ($F'lac^{-}$) wachsen auf CL Agarplatten farblos und sind somit deutlich von den blau erscheinenden $F'lac^{+}$-Kolonien zu unterscheiden.

Bei der Eliminierung von R-Faktoren wurden von den Cl-Agar-Platten jeweils 48 Einzelkolonien in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit je o,2 ml Nähr-I-Bouillon als Inhalt eingeimpft und nach steriler Abdeckung über Nacht bei $37^{o}C$ bebrütet.

Die Weiterverarbeitung der gewachsenen Einzelkolonien erfolgt mit der Replika-Technik (s. 2.7)

2.7 Replika-Technik

Die nach dem unter 2.6 beschriebenen Verfahren auf Mikrotiterplatten erhaltenen 48 Einzelkolonien wurden mit einem vorher abgeflammten Stempel mit Stahlstiften auf vorbereitete CL-Agar-Platten mit Antibiotikazusatz (s. 2.37 - 2.3.16) und auf Kontrollplatten ohne Antibiotika überstempelt . Als

weitere Kontrolle diente die Überstempelung von Antibiotika-sensiblen (E.coli W 3110 ohne Plasmid) und Antibiotika-resistenten Stämmen auf alle Platten.

Nach 18-stündiger Bebrütung bei 37°C konnte durch Vergleiche mit den Kontrollplatten festgestellt werden auf welchen Antibiotikaplatten welche Kolonien nicht mehr wuchsen.Diese Kolonien hatten ihr R-Plasmid verloren und waren Antibiotika-sensibel geworden.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden alle Kolonien, die auf einer Antibiotika-haltigen Platte nicht gewachsen waren im Antibiogramm untersucht. Dazu wurden die Kontrollplatten mit sterilen Glasstäbchen in 1ml Müller-Hinton-Bouillon eingeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet; zur Kontrolle wurden je eine Antibiotika-resistente Einzelkolonie und eine Antibiotika-Sensible Kolonie von E.coli W 3110 dem gleichen Verfahren unterzogen.
Am nächsten Morgen erfolgte die Entnahme und Verdünnung von o,5 ml der getrübten Bakteriensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1000.

2 ml dieser Verdünnung wurden jeweils auf Cl-Agar-Platten gegossen, gleichmäßig verteilt und mit der Wassertrahlpumpe abgesaugt. Anschließend erfolgte die Auflage von Antibiotika-Blättchen, um die Wachstumshemmung der sensibel gewordenen Bakterienkolonien durch die Antibiotika festzustellen.

Nach 18-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Hemmhofdurchmesser um die Antibiotika-Blättchen herum mit dem Lineal ausgemessen. Man erhielt nun aufgrund der Größe des Hemmhofdurchmessers eine Aussage darüber, ob die Einzelkolonien gegen das betreffende Antibiotikum sensibel geworden oder resistent geblieben waren.

Als Richtlienen für die Bewertung diente die Empfehlung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (6).

3. Eigene Ergebnisse

3.1 Bestimmung der MHK der verwendeten Bakterienstämme

Da zur Elimination von Plasmiden Wirksubstanzkonzentrationen unterhalb der MHK benötigt werden, bestimmte ich die MHK der Diazaborine CG 3401 und WH13 gegenüber den zu untersuchenden Bakterienstämmen.
Die Ergebnisse sind in Tabelle I dargestellt.

Tabelle I:

Stamm	MHK (ug/ml) CG3401	MHK (ug/ml) WH 13
W 3110Rif^{r}F'lac$^+$	128	128
W 3110Nx^r F'lac$^+$	256	256
W 3110nx^r lac$^+$R1767	32	64

3.2 Elimination von R 1767 durch Diazaborin CG 3401 und WH 13

Als nächstes widmete ich mich der Frage, ob die Substanz WH 13, die von der Herstellerfirma als verbessertes Nachfolgepräparat des Diazaborins CG 3401 beschrieben wird, ähnlich wie dieses dazu in der Lage ist, R-Plasmide oder R-Determinanten zu eliminieren.
Der Versuch wurde nach der unter 2.6 und 2.7 beschriebenen Methode angesetzt, verwandt wurde der Stamm E.coli W 3110 $Nx^r lac^+$ mit R 1767. Das Ergebnis des 1. Versuches (s.Tabelle II) ist ein fast 100%-iger spontaner Verlust der T-Determinanten, da T auch aus den nicht (mit Oug/ml Diazaborin) behandelten Kulturen eliminiert wird.
Der 2. Versuch mit Diazaborin CG 3401 und WH 13 erbrachte für CG 3401 bei 8 ug/ml Wirksubstanz für die A- und T-Determinanten eine Eliminationsrate von 2% für
WH 13 bei 8 ug/ml für A 6,2% für T 10,4%,
bei 16 ug/ml für A 4,1% für T 4,1%,
bei 32 ug/ml für A 10,4% für T 20,8%.
Im 3. Versuch nur mit Diazaborin CG 3401 wurde keine Elimination für A und T erreicht, die S-Determinante wurde in 12,0% spontan eliminiert. Der 4. und 5. Versuch ebenfalls mit Diazaborin CG 3401 brachten keine Elimination. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Verlust der plasmidkodierten Eigenschaften tritt auch ohne Einsatz eliminierender Substanzen spontan auf. Daher wurde bei jedem Versuch auch eine Reihe ohneSubstanz angesetzt. Die dabei erreichten Werte werden von den Werten , die unter Einsatz von eliminierenden Substanzen erreicht wurden, subtrahiert. So wurde sichergestellt , daß die Werte, die wirklich durch die Substanz erreichte Elimination wiedergeben. D.h. zum Beispiel für Versuch 1 Tab.II, daß die Eliminationsrate für 8 ug WH13/ml nur 2% beträgt, da von erzielten 100% Elimination 98% spontane Elimination subtrahiert werden mußten. Diesem Verfahren wurden alle Werte unterzogen.

Substanz Konz. ug/ml	Determ.	1.Versuch WH 13 % E.	2.Versuch CG 3401 % E.	2.Versuch WH 13 % E.	3.Versuch CG 3401 % E.	4.Versuch CG 3401 % E.	5.Versuch CG 3401 % E.
0	A	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
8	A	0	2.05	6.25	0	0	0
	T	2	2.10	10.40	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
16	A	0	0	4.10	0	0	0
	T	0	0	4.10	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
32	A	-	-	10.40	0	0	0
	T	-	-	20.80	0	0	0
	C	-	-	0	0	0	0
	S	-	-	0	0	0	0

Tabelle II Elimination von R 1767 aus E.coli W 3110 Nx^r lac^+ mit Diazaborin Cg 3401 und WH 13. Die Eliminationsquote ist in % angegeben.

3.3 Elimination von F'lac$^+$ durch Diazaborin CG 3401 und WH 13

Da der Versuch 3.2 die Werte von Böffel nicht erreichen konnte - Elimination von R 1767 durch Diazaborin CG 3401 in bis zu 67% der Fälle - versuchte ich die Elimination von F'lac mit Diazaborin CG 3401 und WH 13. Böffel konnte F'lac in 28% der Fälle mit Diazaborin CG 3401 eliminieren. Der Versuch wurde nach der unter 2.6 beschriebenen Methode angesetzt und mit beiden Substanzen parallel durchgeführt. Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

a) E.coli W 3110 Rif^r F'lac$^+$

b) E.coli W 3110 Nx^r F'lac$^+$

Die Ergebnisse sind ausführlich in Tabelle III und VI dargestellt.

Substanz Konz. (ug/ml)	1.Versuch CG 3401 % E.	1.Versuch WH 13 % E.	2.Versuch CG 3401 %E.	2.Versuch WH 13 %E.	3.Versuch CG 3401 % E.	3.Versuch WH 13 % E.
0	0	0	0	0	0	0
1	-	-	1	1	-	-
2	0	0	9	4	-	-
4	-	-	0	4	-	-
8	0	0	9	0	2	0
16	-	-	4	0	0	0
32	0	2.5	7	4	0	0
64	-	-	-	6	-	-

Tabelle III Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Rif^r mit Diazaborin CG 3401 und WH 13. Die Eliminationsquote ist in % angegeben (% E.).

Substanz Konz. (ug/ml)	1.Versuch CG 3401 % E.	1.Versuch WH13 % E.	2.Versuch CG 3401 % E.	2.Versuch WH 13 % E.	3.Versuch CG 3401 % E.	3.Versuch WH 13 % E.
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	-	-
8	0	0	0	0	98	1
16	-	-	0	0	98	11.6
32	0	0	0	0	-	2

Tabelle IV Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 und WH 13. Die Eliminationsquote ist in % angegeben.(% E.)

3.4 Zeitabhängigkeit der Elimination von R 1767 mit Diazaborin CG 3401 aus E.coli W 3110 Nx^r

Da die bisher erzielten Ergebnisse wenig aussagekräftig waren, versuche ich nun durch die Veränderung einzelner physikalischer Parameter, die Eliminationsquote zu optimieren. Zuerst untersuchte ich den Einfluß der Zeit auf die Elimination.

Dazu diente folgender Versuchsaufbau:

In drei Röhrchen mit 4,5 ml NI-Bouillon und einmal 0; einmal 16 und einmal 1000 ug Diazaborin CG 3401/ml wurden je o,1 ml einer 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten, über Nacht gewachsener Bakterienkultur des zu untersuchenden Stammes gegeben (standardisierte Keimeinsaat). Diese Röhrchen wurden bei 37°C inkubiert, nach 0, 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden wurde je eine Probe entnommen und nach der unter 2.6 und 2.7 beschriebenen Methode weiter verarbeitet. Es wurden nur die A- und T--Determinanten untersucht. Für keine der angegebenen Konzentrationen und Zeitpunkte ergab sich eine Elimination. Das Ergebnis der Versuche war negativ.

(s. Tabelle V)

In den folgenden Versuchen untersuchte ich zunächst die Abhängigkeit vom pH-Wert und habe dann die Abhängigkeit von der Zeit untersucht. (3.7)

Zeit (h)	D	Konz.(ug/ml)	0 % E.	16 % E.	1000 % E.
0	A		0	0	0
	T		0	0	0
1	A		0	0	0
	T		0	0	0
2	A		0	0	0
	T		0	0	0
4	A		0	0	0
	T		0	0	0
8	A		0	0	0
	T		0	0	0
24	A		0	0	0
	T		0	0	0
48			0	0	keineZellen
			0	0	mehr nachweisbar

Tabelle V Elimination von R1767 aus E.coli W3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Zeit

Temperatur (^oC)	35		36		37		38	
Konz.(ug/ml)	0	32	0	32	0	32	0	32
% Elimination	0	5.5	0	0	0	3.3	0	5.3

TabelleVI Elimination von $F'lac^+$ aus E.coli W3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Temperatur.Die Eliminationsquote ist in % angegeben.

3.5 Temperaturabhängigkeit der Elimination von F'lac$^+$ mit Diazaborin CG 3401

Der nächste von mir untersuchte Parameter war die Temperatur. Benutzt wurde E.coli W 3110 Nx^{r}F'lac$^+$. Der Versuch wurde wie folgt angesetzt:
In vier Röhrchen mit je 4,5 ml NI Bouillon wurden o,5 ml einer mit Aqua dest. zubereiteten Lösung von 320 ug Diazaborin/ml zugegeben, so daß eine Konzentration von 32 ug Diazaborin/ml resultierte. 4 weiteren Röhrchen mit 4,5ml NI Bouillon wurde lediglich o,5 ml Aqua dest zugegeben. Dann wurde allen Röhrchen O,1 ml der Bakteriensuspension des 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten,über Nacht gewachsenen zu untersuchenden Stämme zugegeben. Je ein Röhrchen mit O und 32 ug Substanz/ml wurde bei 35°C, 36°C, 37°C und bei 38°C 18 Stunden lang im Wasserbad bebrütet. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter 2.6 beschrieben. Die Diazaborin-Konzentration von 32 ug/ml wurde gewählt weil bei höheren Konzentrationen bei 35°C und 38°C kein ausreichendes Wachstum mehr vorhanden ist.
Die Werte sind in Tabelle VI zusammengestellt.
Eine Temperaturabhängigkeit konnte mit diesem Versuch nicht nachgewiesen werden.

3.6 Einfluß des pH-Wertes auf die Elimination von F'lac$^+$ durch Diazaborin CG 3401

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Elimination zu untersuchen, wurden die Stämme E.coli W 3110 Rif^{r}F'lac$^+$ und E.coli Nx^{r}F'lac$^+$ benutzt.

Der Ansatz des Versuches war wie folgt:
Es wurde NI-Bouillon mit einem pH-Wert von 6,6 - 8,0 in Schritten von 0,2 mit Hilfe von Tris-Puffer (s.2.3.5) hergestellt. Anschließend wurden je 4,5 ml der Bouillons in Röhrchen abgefüllt und im Autoklaven sterilisiert. Aus einer vorher zubereiteten Lösung von 40 ug Diazaborin CG 3401/ml wurden je 0,5 ml einer Reihe Röhrchen mit 8 verschiedenen pH-Werten zugefügt, einer zweiten Reihe wurden je 0,5 ml Aqua dest. zugefügt. Es resultiert also eine Reihe mit den ph-Werten 6,6 - 8,0 und 4 ug Diazaborin CG 3401/ml und eine mit Oug/ml. Alle Röhrchen wurden dann nach der Methode der standardisierten Keimeinsaat (s.o, und 2.6) beimpft mit E.coli W 3110 Nx^{r}F'lac$^+$ und 18 Stunden bei 37^0 C bebrütet. Dann wurde nach der unter 2.6 beschriebenen Methode weiterverfahren. Mit dem Stamm E.coli W 3110 Rif^{r}F'lac$^+$ wurde der Versuch analog angesetzt, allerdings so, daß hier eine Diazaborin-Konzentration von 16 ug/ml resultierte.
Siehe Tabelle VIII und Abb. II; Tabelle VII und VIII, Abb. I und II.
Dieser Versuch zeigt eindeutig eine Abhängigkeit der Elimination vonF'lac$^+$ vom ph-Wert der Nährmedien. Liegt die Eliminationsquote für W 3110 Nx^r beim pH-Wert 7 noch bei 0% so steigt sie beim pH-Wert 7,2 auf 3% an, beim pH-Wert 7,4 beträgt sie 13,5% und fällt dann beim pH--Wert 7,6 auf 7% ab.
Dies veranlasste mich dazu, die Elimination noch einmal in Abhängigkeit von der Zeit beim optimalen pH-Wert von 7,4 zu untersuchen.

pH	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
% E. 4ug/ml	0	0	0	3	13.5	7	3.5	3.8
% E. 0ug/ml	1.4	0.8	1.2	0	0	1.4	0.5	0.5

Tabelle VII Elimination von F'lac$^+$ aus W3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit vom pH.Die Eliminationsquoten sind in % angegeben.

pH	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
% E. 16ug/ml	2.9	7.6	5.7	1.0	6.0	7.2	0	0
% E. 0ug/ml	12.7	6.2	5.5	11.7	7.6	7.6	6.4	7.1

Tabelle VIII Elimination von F'lac$^+$ aus W 3110 Rif^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit vom pH. Die Eliminationsquote ist in % angegeben.

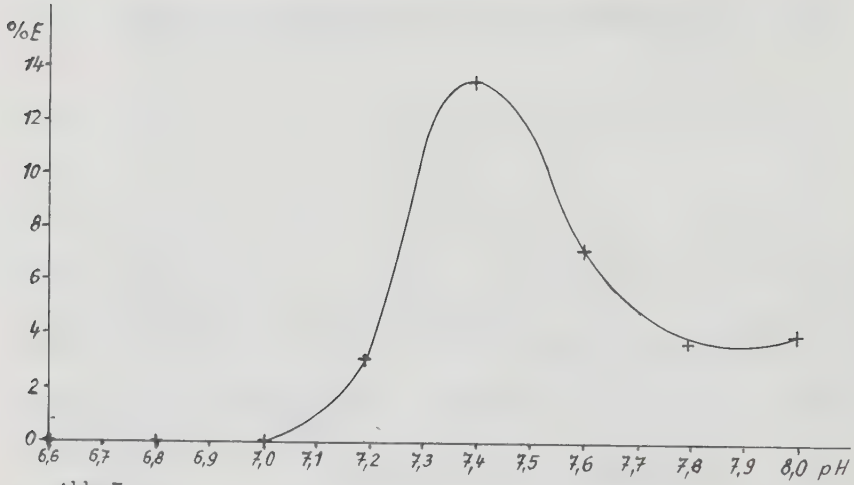


Abb.I

% Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit vom pH-Wert

___ behandelt mit 4 ug/ml

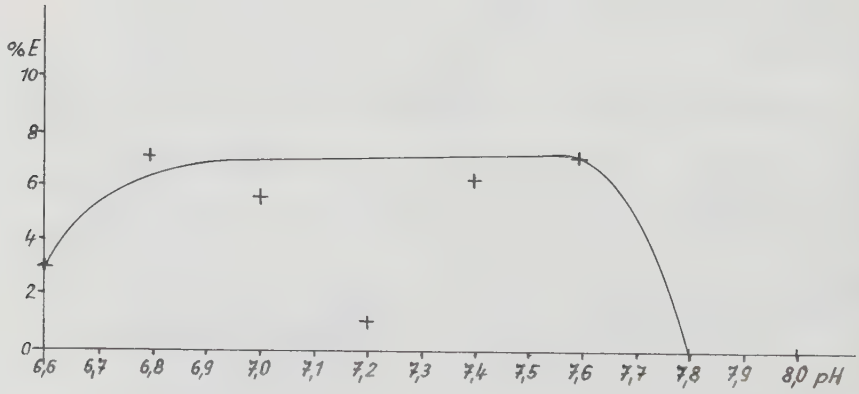


Abb. II

% Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Rif^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit vom pH-Wert

—behandelt mit 16 ug/ml

3.7 Zeitabhängigkeit der Elimination von F'lac$^+$ bei optimaler Wasserstoff-Ionen-Konzentration

Verwendet wurden die Stämme E.coli W 3110 Nx^{r}F'lac$^+$ und W 3110 Rif^r F'lac$^+$ und die Substanz Diazaborin CG 3401. Der Versuch wurde wie unter 2.6 beschrieben angesetzt. Die Diazaborin-Konzentration betrug für den Stamm W 3110 Nx^r 4ug/ml, für den Stamm W 3110 Rif^r 16 ug/ml, der pH-Wert der NI Bouillon 7,4. Nach 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16 und 18 Stunden wurden Proben entnommen und nach der unter 2.6 beschriebenen Methode weiter verarbeitet.(die um O-Werte korrigierten Zahlen wurden in den Tab. IX und X aufgestellt und in Abb. III dargestellt.)
Bei beiden Stämmen lag die höchste Eliminationsrate bei Zeiten von 14–16 Stunden nach Zugabe der Substanz. Für E.coli W 3110 Nx^r lag die höchste Rate 41,5% bei 16 Stunden für E.coli W 3110 Rif^r mit 45,5% bei 14 Stunden. Danach nahm die Eliminationsrate rasch ab.

Zeit (h)	0	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18
% E4ug/ml	0	3.0	0	1.6	0.9	0	3.1	4.8	10.2	41.5	16.1
% E0ug/ml	0	3.1	0	5.4	4.0	4.0	0	8.0	7.3	1.5	1.8

Tabelle IX Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Zeit bei optimalem pH.Die Eliminationsquote ist in % angegeben.

Zeit (h)	0	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18
% E.16ug/ml	0	5.3	-	7.9	23.9	32.3	34.3	42.2	45.5	44.3	35.1
% E. 0ug/ml	0	4.9	-	5.0	7.0	1.0	8.0	2.1	9.4	10.2	7.4

Tabelle X Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Rif^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Zeit bei optimalem pH.Die Eliminationsquote ist in % angegeben.

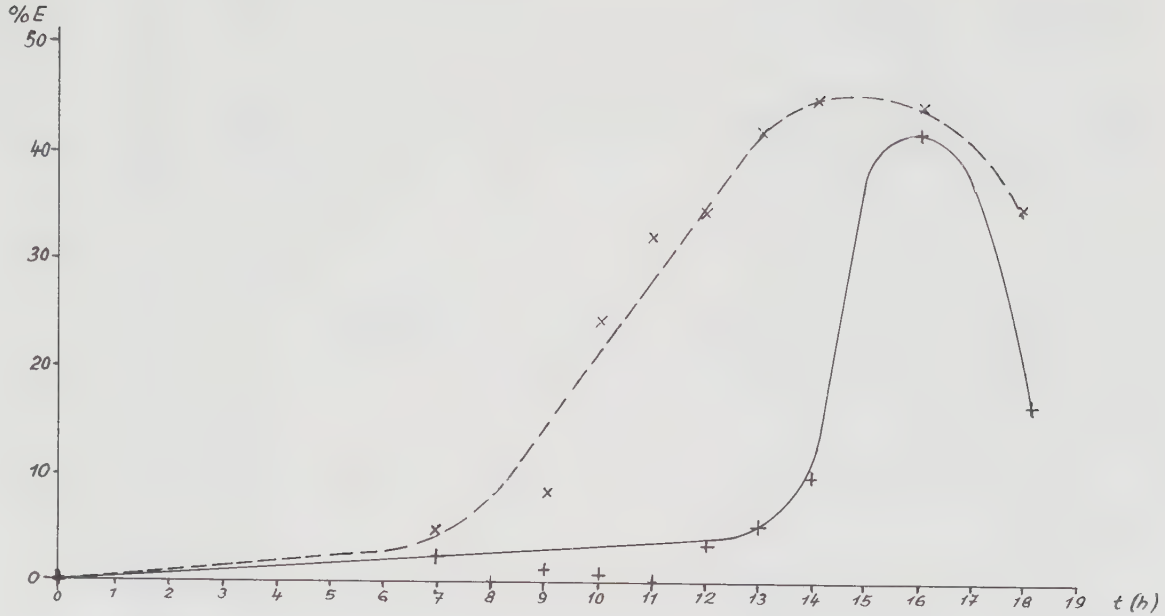


Abb. III

— % Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Zeit +

-- % Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Rif^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Zeit x

3.8 Elimination von F'lac$^+$ bei E.coli W 3110 Nx^r F'lac$^+$ unter Berücksichtigung der Keimzahl.

Um den Abfall der Eliminationsrate nach 14 bzw. 16 Stunden näher zu untersuchen, setzte ich den Versuch wie unter 3.7 beschrieben noch einmal an, zeichnete aber gleichzeitig die Keimzahl auf. Dazu benutzte ich die unter 2.5 beschriebene Methode. Verwendet wurde der Stamm W 3110 Nx^r F'lac$^+$ in NI Bouillon pH 7,4 mit 4 ug Diazaborin/ml. Die Eliminierung betrug nach 14 Stunden 16,5%, zum gleichen Zeitpunkt hatte auch die Keimzahl ihre höchste Dichte erreicht, sie betrug 2,3 x 10^8 Zellen/ml. Bei gleichbleibender Keimzahl fiel dann die Eliminationsrate rasch ab und betrug nach 18 Stunden nur noch 11,3% nach 19 Stunden nur noch 5,9%. (s. Tabelle XI und Abb. IV)

Zeit (h)	% E. 4ug/ml	Keimzahl pro ml	% E Oug/ml	Keimzahl pro ml
0	0.3	$2.9x10^5$	0.9	$2.8x10^5$
2	0	$1.6x10^5$	1.0	$8.6x10^6$
4	4.8	$2.0x10^5$	1.0	$7.8x10^7$
6	0	$1.8x10^6$	0	$3.1x10^9$
8	1.0	$6.0x10^6$	0.4	$6.1x10^{10}$
10	5.2	$1.0x10^7$	0.5	$5.0x10^{10}$
12	9.6	$4.8x10^6$	0	$5.7x10^{10}$
14	16.3	$2.3x10^8$	0.1	$6.5x10^{10}$
15	10.0	$2.6x10^8$	0.2	$8.1x10^{10}$
16	13.6	$2.5x10^8$	0	$3.1x10^{10}$
17	11.3	$3.0x10^8$	2.0	$1.9x10^{10}$
18	11.3	$2.2x10^8$	0.2	$3.1x10^{10}$
19	5.9	$1.6x10^8$	0	$4.4x10^{10}$

Tabelle XI Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in Abhängigkeit von der Zeit bei gleichzeitiger Aufzeichnung der Keimzahl/ml. Die Eliminationsquote ist in % angegeben.

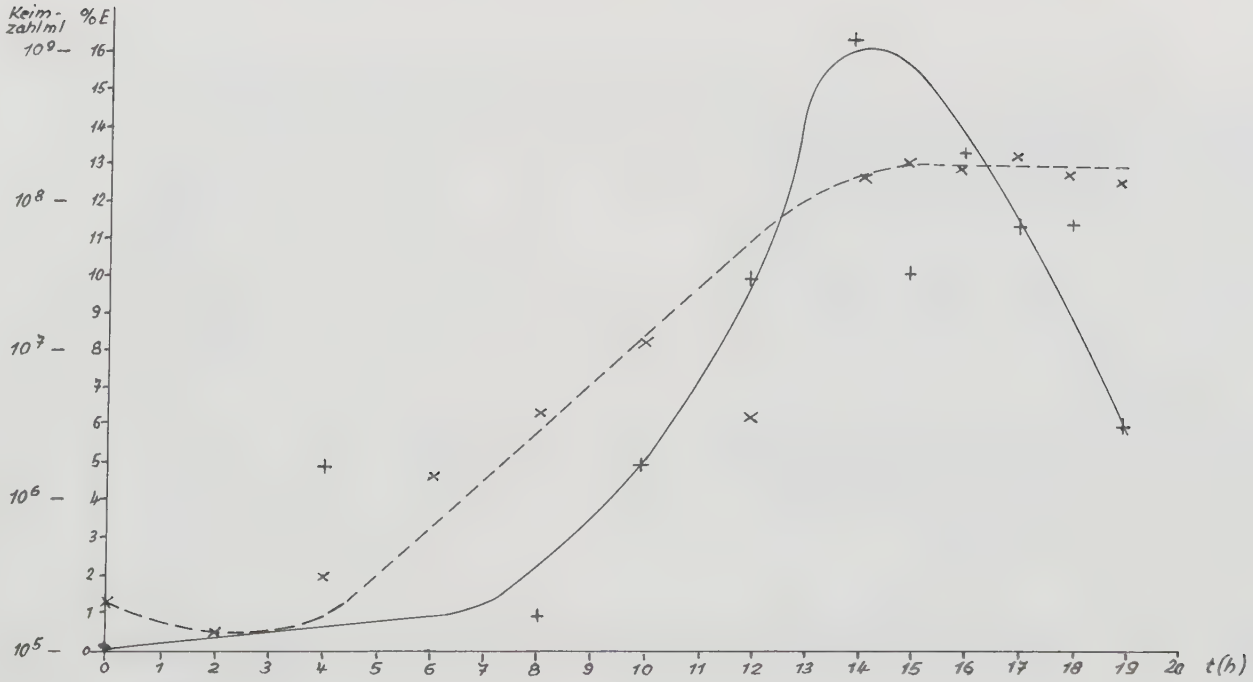


Abb.IV

% Elimination von F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r mit Diazaborin CG 3401 in

—— Abhängigkeit von der Zeit +

- - Keimzahl pro ml x

Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob

1. die Substanz WH 13, ähnlich wie das Diazaborin CG 3401 fähig ist, F- und R-Plasmide zu eliminieren und
2. welche Bedingungen eingehalten werden müssen um eine möglichst hohe Eliminationsrate zu erreichen.

Böffel (2) untersuchte die Wirkung von Dizaborn CG 3401 bezüglich der Elimination von F- und R-Plasmiden und konnte beide Plasmide in unterschiedlich hohem Prozentsatz eliminieren (bis zu 26,8% bei F'lac$^+$ und bis 65,6% bei R 1767). Es gelang ihm eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Eliminierung von F'lac$^+$ bzw. R 1767 und der Konzentration des Diazaborins aufzustellen. In den ersten eigenen Versuchen wurde bezüglich der Elimination von R 1767 mit dem Diazaborin CG 3401 eine maximale Eliminationsrate von 8,2% erreicht, insbesondere konnte keine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgestellt werden, wie aus Tabelle II ersichtlich ist. Auch die Elimination von F'lac$^+$ mit CG 3401 ist nicht annähernd so gut wie bei den Experimenten von Böffel (2) . Aus Tabelle III und IV geht hervor, daß eine maximale Eliminationsrate von 4% erreicht wird, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung läßt sich ebenfalls nicht aufstellen.
Die Versuche zur Elimination von F- und R-Plasmiden durch die Substanz WH 13 waren negativ. Wie aus den Tabellen I-III ersichtlich wird konnte R 1767 in maximal 20,8% der Fälle eliminiert werden, F'lac$^+$ in maximal 11,6%.
Der Unterschied zu den von Böffel (2) erhobenen Befunden ist deutlich.

Hirota (14) hat festgestellt, daß die Elimination durch Aminoacridine von verschiedenen Umweltbedingungen abhängt, die optimiert werden müssen, um ein ausreichendes "curing" der Plasmide aus den Bakterienzellen zu erreichen.

Nach den Angaben dieses Autors müssen die folgenden Bedingungen beachtet werden:

1. pH-Wert
2. Zeit
3. Temperatur
4. Inokulum (s. auch S. 2)

Diese Arbeit zeigt, daß auch für die Elimination von F'lac$^+$ durch Diazaborin CG 3401 zwei Parameter entscheidend sind: pH-Wert und Zeit.

Die ersten Untersuchungen über den Einfluß der Zeit (s. 3.4 Tab. V) und der Temperatur (s. 3.5 Tab.VI) ergaben keinen Hinweis auf eine wesentliche Veränderung der Eliminierungsrate durch diese Parameter.
Anderseits verändert der pH-Wert ganz wesentlich die Eliminationsrate (s. 3.6 Tab.VII und VIII). Für das Plasmid in E.coli W 3110 Nx^r konnte gezeigt werden, daß die Eliminationsrate von 0% bei einem pH-Wert von 6.6 auf 13,5% bei einem pH-Wert von 7,4 ansteigt um dann wieder abzufallen.
Auch für das Plasmid in E.coli W 3110 Rif^r ergibt sich ein Maximum, allerdings bei einem pH-Wert von 7,6.
Hier beträgt die maximale Eliminationsrate 7,2%.
Von diesen Ergebnissen ausgehend gelang es zu zeigen , daß der zweite entscheidende Parameter für die Optimierung der Elimination die Zeit ist (s. 3.7 Tab. IX und X).
Bei optimalem pH-Wert steigt die Eliminationsrate für F'lac$^+$ aus E.coli W 3110 Nx^r nach 14 Stunden auf 45,5% an, um dann rasch wieder abzufallen.

Die verwendeten Plasmide waren konjugativ, sie können ihre eigene Übertragung im Zuge eines Konjugationsvorganges in Gang bringen (Auto-Transfer). Bergmann und Wiedemann (1) konnten zeigen, daß die Übertragungsfrequenz für F-und R-Plasmide gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase besonders niedrig ist, ein Maximum wird aber in der stationären Phase erreicht.

Es überlagern sich zwei Effekte:
1. Elimination und 2. Transfer
Wenn der Versuch zur Elimination also am Ende der logarithmischen Wachstumsphase abgeschlossen wird, dürfte die Übertragung auf gesunde Zellen noch so niedrig sein, das ein optimales Ergebnis zu erwarten ist.
Der Versuch 3.8 Tab. IX zeigt dies deutlich:
Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase, wenn die Übertragungsfrequenz am kleinsten ist, ist die Eliminationsrate am größten, in der stationären Phase, wenn die Konjugationsfrequenz am größten ist, werden die Zellen, die ihr Plasmid verloren haben, durch Konjugation wieder Plasmid-tragend, und damit sinkt scheinbar die Eliminationsrate ab.
Die optimalen Bedingungen für das "curing" des Plasmids F'lac^{+} aus E.coli W 3110 Nx^{r} sind also ein pH-Wert von 7,4 im Nährmedium und eine Zeit von 14 Stunden um das Ende der logarithmischen Wachstumsphase zu erreichen, bei einer Wirkstoffkonzentration von 16 ug/ml Diazaborin CG 3401.
Diese Bedingungen hat Böffel (2) offentsichtlich zufällig eingehalten.

Zusammenfassend muß man feststellen, daß erstens die Substanz WH 13, die sehr ähnliche Struktur und antibiotische Wirkung wie CG 3401 hat, die in sie gesetzten Hoffnungen bezüglich der Elimination nicht erfüllen konnte,und zweitens die Eliminationsrate für CG 3401 sich bei optimalem pH-Wert und in Abhängigkeit von der Zeit beträchtlich steigern läßt. Aber auch CG 3401 kann nicht als Breitspektruminhibitor im Sinne Hahns (10) angesehen werden, da dies gute Eliminationseigenschaften und antibiotische Aktivität vorraussetzt. Seine eliminierenden Eigenschaften sind nicht so positiv, daß es als Breitbandinhibitor in Frage käme. Außerdem ist Diazaborin CG 3401 von der Fa. Chemie-Grünenthal inzwischen wegen toxischer Eigenschaften aufgegeben worden.

Literaturverzeichnis

1 BERGMANN,D., WIEDEMANN,B.
Die Abhängigkeit der R-Faktor-Übetragung von der Wachstumsphase der Donorbakterien bei Escherichia coli.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 223 3030-307 (1973)

2 BÖFFEL,R.
Die Eliminierung von Plasmiden durch das Diazaborin CG 3401
Bonn (1979)

3 BOUANCHAUD,D.H., SCAVIZZI,M.R., CHABBERT,Y.A.
'Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Enterobacteria and Staphylococci'
J. gen. Microbiol. 54: 417-425 (1969)

4 CAIRNS,J.
The Application of Radioantogrphy to the Study of DNA-Viruses
Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology 27: 311-318 (1962)

5 CHEMIE GRÜNENTHAL GMBH, Stolberg/Rheinland
Mitteilungen über das Diazaborin CG 3401: 1-3(1976)

6 PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE EV.
Arbeitsgemeinschaft Resistenz
Empfindlichkeit klinischer Isolate einiger Enterobacteriacae sowie von Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus uund Streptococcus faecalis gegenüber Chemptherapeutika
Ergebnisse einer überregionalen kooperativen Studie aus dem Jahre 1975
Infection, 6: 35-44 (1978)

7 FALKOW,S.
Infectious Multiple Drug Resitance
Verlag: Pion LTD, London (1975)

8 FALKOW,S. CITARELLA, R.V., WOHLHIETER,J.A., WATANABE,T.
The Molecular Nature of R-Factors
J. of Molecular Biology, 17: 102-116 (1966)

9 FRANKLIN/SNOW
Biochemistry of Antimicrbial Action
Verlag: Cox and Wyman LTD, Falkenham, Norfolk,
70-76 (1971)

10 HAHN,F.E.
'Experimental Elimination of R-Factors'
Antibiotics and Chemotherapy
vol 20: 196-226 (1976)

11 HAHN,F.E. CIAK,J.
'Elimination of Bacterial Episomes by DNA-Complexing--Compounds
Ann. N.Y. Acad. Sci. 182: 295-304 (1971)

12 HAHN,F.E. CIAK, J.
'Elimination of Plasmidic Determinants by DNA-Complexing Compounds'
Topics in Infect. Diseases I
Verlag: Springer, New-York-Wien: 99-113 (1975)

13 HAHN,F.E., J.CIAK
'Bactericidal Effects of Combinations of Ampicillin with Anti-R-Plasmid Compounds on Salmonella typhimurium $R1^+$
Antimicrobial Agents And Chemotherapy
Vol 11, No 1 176-177 (1977)

14 HIROTA,Y.
'The Effect of Acridine Dyes on Mating Type in Escherichia Coli'
Proc. natn. Acad. Sci. USA 46: 57-64 (1960)

15 HIROTA,Y., ILJUMA,T.
'Acriflavin as an Effective Agent for Eliminating--F-Factor in Escherichia coli. K-12'
Nature, Londen, 180: 655-656 (1957)

16 JAWETZ,E., MELNICK, J.L., ADELBERG,E. A.
Medizinische Mikrobiologie
Verlag: Springer, Berlin
3. Auflage: 59-68 (1973)

17 LERMAN, L.
'Acridine Mutagens and DNA-Structure'
J. of Cellular and Comparative Physiology
64: 1-18, Suppl. 1 (1964)

18 WATANABE,T., FUKASAWA, T.
' Episome Mediated Transfer of Drug-Resistance in Enterobacteriacae'
' II. Elimination of Resistance Factors With Acridine Dyes'
J. Bact. 81: 679-683 (1961)

19 WIEDEMANN,B.
Die biologische Aktivität von Resistenzplasmiden
Sonderdruck aus Immunität und Infektion
Zeitschrift für Infektionkrankheiten und klinische Immunologie
Verlag: Gerhard Witzstock GmbH, Baden-Baden,
Nr. 5: 223-230 (1974)

Ich danke Herrn Prof. Dr. Brandis für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Wiedemann für die freundliche Überlassung des Themas und seiner Beratung in theoretischen und praktischen Fragen der vorliegenden Arbeit. Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Anleitung bei der technischen Durchführung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

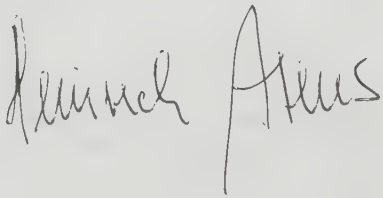
Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Der Einfluß physikalischer Parameter auf die Eliminierung von Plasmiden durch die Diazaborine CG 3401 und WH 13"

im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Medizinische Mikrobiologie für Pharmazeuten unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Wiedemannn ohne fremde Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. an keinem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bonn, den 14.05.80



Lebenslauf

Name:	Heinrich Arens
geboren:	30. März 1955 in Brüggen
Eltern:	Max Arens und Elisabeth Arens geb. Tiskens
Grundschule:	1961 - 1965 in Brüggen-Born
Gymnasium:	1965 - 1973 St. Wolfhelms-Gymnasium in Schwalmtal-Waldniel
Reifeprüfung:	23.Mai 73 am gleichen Gymnasium
Studium:	Wintersemester 1973/74 Germanistik und Geschichte TH Aachen ab Sommersemester 1974 Studium der Humanmedizin an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Ärztliche Vorprüfung:	bestanden im März 1976 in Bonn
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	bestanden im März 1977 in Bonn
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	bestanden im März 1979 in Bonn
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	bestanden im April 1980 in Bonn